

## METHOD OF CORRECTION OF IMMUNE SYSTEM OF LIVING BODY

**Publication number:** RU2167659 (C1)

**Publication date:** 2001-05-27

**Inventor(s):** ZHILOV V KH

**Applicant(s):** NOJ MEDITSYN MEDIKOR; TS SOVREMEN AOZT

**Classification:**

- **international:** A61K31/502; A61P37/02; A61K31/502;  
A61P37/00; (IPC1-7): A61K31/502;  
A61P37/02

- **European:** A61K31/502

**Application number:** RU20000120330 20000802

**Priority number(s):** RU20000120330 20000802

**Also published as:**

WO0209681 (A2)

WO0209681 (A3)

UA81744 (C2)

EP1315497 (A2)

AU7093401 (A)

### Abstract of RU 2167659 (C1)

medicine, veterinary science, immunology. SUBSTANCE: invention proposes administration of pharmacologically acceptable amino- derivatives of 2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione in effective doses from 0.2 mcg to 1000 mg. EFFECT: broadened field of use of aminophthalazinedione compounds in broad range of effective doses. 2 cl, 10 tbl, 9 ex

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide



(19) RU (11) 2 167 659 (13) С1  
(51) МПК<sup>7</sup> А 61 К 31/502, А 61 Р 37/02

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 2000120330/14, 02.08.2000  
(24) Дата начала действия патента: 02.08.2000  
(43) Дата публикации заявки: 27.05.2001  
(46) Дата публикации: 27.05.2001  
(56) Ссылки: RU 2113222, 1998. US 2654689, 1953.  
(98) Адрес для переписки:  
121374, Москва, ул.Алексея Свиридова, 15,  
корп.3, ЗАО "Центр Современной Медицины  
"Медикор"

(71) Заявитель:  
Закрытое акционерное общество "Центр  
современной медицины "Медикор"  
(72) Изобретатель: Жилов В.Х.  
(73) Патентообладатель:  
Закрытое акционерное общество "Центр  
современной медицины "Медикор"

**(54) СПОСОБ КОРРЕКЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЖИВОГО ОРГАНИЗМА**

(57) Реферат:  
Изобретение относится к области  
медицины и ветеринарии, в частности к  
иммунологии, и касается способов коррекции  
иммунной системы живого организма.  
Сущность изобретения - введение  
фармакологически приемлемых

аминопроизводных  
2,3-дигидро-1,4-фталазиниона в  
эффективной дозе 0,2 мкг - 1000 мг. Способ  
обеспечивает расширение области  
применения аминофталазинионовых  
соединений в широком интервале  
эффективных доз. 1 з.п. ф-лы. 10 табл.

RU 2 167 659 С1

RU 2 167 659 С1



(19) RU (11) 2 167 659 (13) C1  
(51) Int. Cl. 7 A 61 K 31/502, A 61 P 37/02

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2000120330/14, 02.08.2000

(24) Effective date for property rights: 02.08.2000

(43) Application published: 27.05.2001

(46) Date of publication: 27.05.2001

(98) Mail address:  
121374, Moskva, ul.Alekseja Sviridova, 15,  
korp.3, ZAO "Tsentr Sovremennoj Meditsiny  
"Medikor"

(71) Applicant:  
Zakrytoe aktsionernoje obshchestvo "Tsentr  
sovremennoj meditsiny "Medikor"

(72) Inventor: Zhilov V.Kh.

(73) Proprietor:  
Zakrytoe aktsionernoje obshchestvo "Tsentr  
sovremennoj meditsiny "Medikor"

**(54) METHOD OF CORRECTION OF IMMUNE SYSTEM OF LIVING BODY**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, veterinary science, immunology. SUBSTANCE: invention proposes administration of pharmacologically acceptable amino-

2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione in effective doses from 0.2 mcg to 1000 mg. EFFECT: broadened field of use of aminophthalazinedione compounds in broad range of effective doses. 2 cl, 10 tbl, 9 ex

R U 1 6 7 6 5 9 C 1

R U 2 1 6 7 6 5 9 C 1

Изобретение относится к новой современной области медицины и ветеринарии - иммунологии и может быть применено для профилактики и лечения различных заболеваний, называемых иммунопатологией, в частности такие как токсикоинфекционные, онкологические, аллергические и другие.

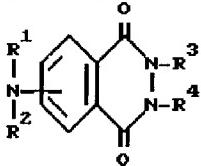
Известен широкий круг различных препаратов, обладающих иммуностимулирующей либо иммунодепрессивной активностью. В частности, к иммуностимулирующим препаратам относятся такие известные препараты как тактивин, декарис, дифазол и др., к иммунодепрессивным - меркаптопурин, циклофосфамид и др. Однако большинство известных препаратов обладает односторонним действием на иммунную систему.

Известно, что иммуномодулирующей активностью обладает 2-амино-1,2,3,4-тетрагидрофталазин-1,4-диона натриевая соль дигидрат, которая вводится пациентам при слабой реакции клеточного иммунитета, например при наличии злокачественных новообразований, вызывая активацию макрофагов, интерлейкинов и других острофазных белков. Данный препарат применяется в диапазоне дозировок 10 - 1000 мг и вводится в виде инъекций, например, по 100 мг в 1 мл воды, либо перорально, например, по 1000 мг препарата в изотоническом растворе [РФ, патент N 2113222, А 61 К 31/04, 1998].

Настоящее изобретение представляет собой способ иммунокоррекции с применением широкой группы фармакологически приемлемых солей аминопроизводных 2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона в эффективной дозе, составляющей 0,2 мкг - 1000 мг.

Новое изобретение отличается от прототипа тем, что увеличивает число иммунокорректирующих аминофталазиндионовых соединений и значительно расширяет их область применения как иммунодепрессантов, так и иммуностимуляторов в медицине и ветеринарии при использовании значительно более широкого, чем в прототипе, интервала эффективных доз.

В качестве иммунокорректоров в настоящем изобретении используются известные фармакологически приемлемые химические соединения, применявшиеся ранее по другому назначению, например fungicidiы [США, патент N 2654689, кл. 514-248, публ. 1953], имеющие следующую общую формулу:



где R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = H, алкил-, арил-, алкиларил-, атомы металлов, анионы.

К таким иммуноактивным соединениям данной группы, например, относятся:

- Li, K, Na, Ca, Ba, Mg, Ag соли 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона;
- Li, K, Na, Ca, Ba, Mg, Ag соли

6-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона;

- 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона гидрохлорид, сульфат, фосфат, цитрат, тартрат, фумарат, оксалат, малеат, ацетат, нитрат, гидробромид;

- соответствующие соли 6-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона;

- 5-метиламино-, 6-метиламино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндионы и соответствующие им фармакологически приемлемые соли;

- 5,5-диметиламино-, 5,5-диэтиламино-, 5,5-дипропиламино-, 5,5-дигидропропиламино-, 5,5-дипентиламино-, 6,6-диметиламино-, 6,6-диэтиламино-, 6,6-дигидропропиламино-, 6,6-дигидропентиламино-,

15 6,6-дипентиламино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндионы и соответствующие им фармакологически приемлемые соли;

- 5-фениламино-, 6-фениламино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндионы и соответствующие им фармакологически приемлемые соли;

20 Эффективный интервал доз от 0,2 мкг до 1000 мг подбирался экспериментальным путем. Выбор в конкретном случае той или иной эффективной дозы в указанном интервале зависит от характера заболевания, веса, возраста пациента (человека либо животного), что подтверждается нижеприведенными примерами и таблицами. Иммунокорректоры могут вводиться в организм в виде инъекций, перорально либо в составе наружных средств.

Оценка иммуногенных и аллергенных свойств предлагаемых соединений проводилась в соответствии с методическими рекомендациями "Экспериментальное изучение иммунотропной активности фармакологических препаратов", Минздрава России [Р. М. Хайтов, И. С. Гущин, Б.В. Пинегин, А. И. Зебрев, Ж. Ведомости фармакологического комитета, 1999, N 1, с. 31-36].

40 В работе были использованы мыши различных линий в зависимости от применяемого метода исследования. Все мыши были получены из питомника "Столбовая" АМН РФ. При изучении образования антител и антителообразующих клеток использовали мышей линии СВА и С 57BL<sub>6</sub> весом 16-18 грамм.

50 Действие соединений *in vitro* на пролиферацию лимфоидных клеток и индукцию интерлейкина-2 оценивали, используя мышей линии BalB/c, весом 16-18 г. Животные в контрольных и опытных группах были одного пола, одного веса. Каждая доза препарата испытывалась на 10 животных, всего было использовано более 800 мышей.

55 Оценку аллергизирующего действия препаратов проводили на морских свинках, самках весом 250 - 300 г, полученных из Центрального питомника лабораторных животных АМН РФ. Всего использовано 70 морских свинок. Препараты вводили животным внутрибрюшинно и внутрикожно.

60 Образование антител и антителообразующих клеток исследовали на модели бараньих эритроцитов, находящихся в растворе Олсвера. Эритроциты получены из питомника института полимиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

R U 2 1 6 7 6 5 9 C 1

C 1 6 7 6 5 9 C 1 R U

Пример 1. Исследование влияния кальциевой соли 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона на неспецифическую резистентность организма.

Мышам линии C<sub>57</sub>BL<sub>6</sub> вводили препарат внутрибрюшинно в дозах от 200 до 0,2 мкг с десятикратным интервалом в 0,5 мл физиологического раствора за 2 часа до заражения мышей. Мышей заражали S/Typhi в дозе 1•10<sup>4</sup> микробных клеток, другую группу животных заражали E.Coli шт. 264 в дозе 1•10<sup>8</sup> микробных клеток. Контролем служили мыши, зараженные той же дозой микробной культуры, но не получавшие препарата. Гибель мышей учитывали ежедневно в течение 10 дней.

В результате эксперимента было установлено, что влияние препарата на неспецифическую резистентность мышей линии C<sub>57</sub>BL<sub>6</sub> зависело от введения дозы и инфекционной модели.

При заражении мышей E.Coli препарат в дозе от 200 до 2 мкг на мышь не влияет на резистентность организма мышей, и продолжительность жизни их была такой же, как и в контроле. (Таблица 1).

Таким образом, доза 0,2 мкг обеспечивает достоверное (в 2,2 раза) увеличение продолжительности жизни экспериментальных животных при заражении E. Coli.

Пример 2. Исследование влияния калиевой соли 5-амино-2,3-дигидродииона на фагоцитоз *in vivo* и *in vitro*.

Мышам линии C<sub>57</sub>BL<sub>6</sub> вводили различные дозы препарата от 200 до 2 мкг на мышь и через 24 часа их брали в опыт. Животным вводили внутрибрюшинно 3 мл 3%-ного раствора пептона и через 2 часа их умерщвляли с помощью хлороформа. Животных вскрывали в асептических условиях. Из брюшной полости отсасывали жидкость с помощью пастеровской пипетки, помещали ее в центрофужные пробирки и центрифугировали в течение 10 минут при 1000 об./мин. Осадок ре悬浮ировали в среде 199, подсчитывали число клеток в камере Горяева и доводили их до концентрации 2 млн/мл по нейтрофилам. К клеткам добавляли равный объем St. aureas шт. 1991 в соотношении 1:10 и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. После инкубации делали мазки на предметном стекле, фиксировали в метаноле 20 минут и окрашивали краской Романовского-Гимза в течение 30 минут.

Для изучения фагоцитарной активности макрофагов животных брали в опыт на 3 сутки после введения пептона. Далее опыт проводили, как и в опыте с нейтрофилами. Учет результатов осуществляли под микроскопом при увеличении 90 раз. Подсчитывали фагоцитарный индекс и фагоцитарное число.

Результаты эксперимента показали, что препарат в дозе 200 мкг не оказывает стимулирующего действия на фагоцитирующие клетки, а в дозах 2 мкг и 20 мкг - достоверно усиливает поглотительную способность клеток.

Для оценки препарата на фагоцитоз *in vitro* брали кровь у донора из кубитальной вены в пробирку с гепарином из расчета 10 ЕД на 1 мл крови. К 2 мл крови приливали 0,8 мл 3%-ного раствора желатины, приготовленной

на среде 199. Инкубировали пробирки в термостате 20 минут при 37°C. Затем в центрифужную пробирку отсасывали надосадочный слой, содержащий клеточные элементы. Клетки 2 раза промывали средой 199 центрифугированием при 1000 об./мин. К осадку добавляли 1 мл среды 199, подсчитывали в камере Горяева нейтрофилы, затем готовили на среде 199 клеточную суспензию, содержащую 2 млн. нейтрофилов в 1 мл. Одновременно готовили взвесь St.aureus в концентрации 20 млн/мл. Страфиллококовую взвесь предварительно опсонизировали равным объемом пудовой сыворотки человека в течение 20 мин в термостате при 37°C, затем центрифugировали и отмывали средой 199. К смеси нейтрофилов и страфиллока (в равных объемах) добавляли препарат в концентрациях 200, 20 и 2 мкг на 1 мл, в контрольные пробирки - среду 199. После инкубации в термостате 30 мин при 37°C пробирки центрифугировали и готовили препараты по описанной выше методике. Сравнивали в опыте и контроле фагоцитарный индекс и фагоцитарное число.

Полученные результаты представлены в Таблице 2. Полученные данные свидетельствуют о том, что препарат, введенный мышам в дозах от 200 до 2 мкг, оказывает стимулирующее действие на фагоцитарную активность макрофагов, а в дозе 200 мкг - не влияет на фагоцитарную функцию *in vivo*.

В опытах *in vitro* изученный препарат в дозах 20 и 2 мкг достоверно увеличивает поглотительную способность популяции нейтрофилов и практически не влияет на их переваривающую активность.

Пример 3. Исследование влияния натриевой соли 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона на гуморальный иммунный ответ.

Мышей иммунизировали внутрибрюшинно отмытым физиологическим раствором эритроцитами барана в дозе 5•10<sup>6</sup> клеток. Другие группы животных получали эритроциты барана и препарат в дозах от 200 до 0,2 мкг с десятикратным интервалом. При изучении продуктивной фазы гуморального иммунного ответа препарат вводили мышам на 5-е сутки после иммунизации их эритроцитами. Кровь у мышей забирали на 7, 14 и 21 день после иммунизации. Антитела определяли в реакции гемагглютинации. Сыворотку крови мышей разводили двукратно в 96-луночных планшетах для иммунологических реакций с U-образным дном в объеме 25 мкл. В контрольную лунку вносили 25 мкл физиологического раствора. Во все лунки добавляли 25 мкл 1%-ного раствора эритроцитов барана. Планшеты инкубировали в термостате в течение 2-х часов при 37°C. За титр принимали последнее разведение исследуемой сыворотки, при которой еще наблюдается положительный результат. Контрольная лунка должна быть отрицательной.

При изучении влияния препарата на индуктивную фазу иммунного ответа его вводили одновременно с эритроцитами барана. Кровь у мышей забирали на 7, 14 и 21 сутки после иммунизации. Антитела определяли в реакции гемагглютинации, как указано выше.

Результаты, полученные при совместном

R  
U  
2  
1  
6  
7  
6  
5  
9  
C  
1

C 1  
6  
7  
6  
5  
9

введении эритроцитов барана (ЭБ) и препарата, представлены в Таблицах 3, 4. У животных низкореагирующих линий С<sub>57</sub>BL<sub>6</sub> наблюдается тенденция к увеличению титров гемагглютининов на 21 день после введения доз 0,2 и 20 мкг на мышь. Изучение влияния препарата на продуктивную фазу иммунного ответа мышей свидетельствует о супрессивном действии всех доз препарата на мышах высокореагирующих линий СВА и о тенденции роста гемагглютининов на 21 день после введения препарата мышам низкореагирующих линий С<sub>57</sub>BL<sub>6</sub>.

Таким образом, выявлена способность натриевой соли 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона изменять антителообразование в зависимости от дозы и исходной иммунореактивности организма. При введении препарата в продуктивную фазу, т.е. на 5-й день после введения антигена (эритроцитов барана), он угнетает в широком диапазоне доз антителообразование на 7-й и 14-й дни после иммунизации у мышей линии СВА, генетически высокочувствительных к эритроцитам барана. У низко чувствительных мышей линии С<sub>57</sub>BL<sub>6</sub> препарат вызывает существенное повышение титров гемагглютининов на 21 сутки эксперимента.

Пример 4. Исследование влияния натриевой соли 6-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона на клеточный иммунный ответ.

Для оценки влияния препарата на клеточный иммунный ответ использовали реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Для сенсибилизации мышам подкожно вводили 1•10<sup>7</sup> эритроцитов барана в объеме 20 мкл. Препарат вводили одновременно с сенсибилизирующей и разрешающей дозой антигена в дозах от 0,2 до 2000 мкг с десятикратным интервалом. Разрешающую дозу 1•10<sup>8</sup> эритроцитов барана вводили на 5-й день после сенсибилизации под апоневротическую пластинку левой задней конечности. В контрольную (правую) лапу в качестве контроля вводили физиологический раствор в объеме 20 мкл. Учет интенсивности воспалительной реакции осуществляли через 24 часа после введения разрешающей дозы антигена. Для этого мышей забивали, сразу после этого обе лапки отрезали на уровне голеностопного сустава и взвешивали на торсионных весах. Индекс реакции (ИР) определяли по разнице массы опытной (О) и контрольной (К) лапок.

$$ИР = \frac{O-K}{K} \times 100\%.$$

Результаты исследования влияния препарата на клеточный иммунный ответ по реакции ГЗТ выявили тенденцию увеличения индекса реакции на мышах обеих линий по мере уменьшения дозы препарата (Таблица 5). Следует отметить, что увеличение индекса реакции особенно выражено у низкореагирующей линии С<sub>57</sub>BL<sub>6</sub> по мере уменьшения дозы препарата. При этом доза 200 мкг препарата приводила к подавлению ГЗТ у высокореагирующей линии СВА.

Таким образом, препарат в дозе 200 мкг у мышей линии СВА супрессировал развитие реакции ГЗТ. Остальные дозы препарата (20 - 2 мкг) не влияли на развитие ГЗТ у мышей обеих оппозитно реагирующих линий.

Пример 5. Исследование влияния гидрохлорида 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона на пролиферацию лимфоидных клеток.

Для постановки иммунологических реакций у животных забирали селезенку. Органы надрезали и гомогенизировали в стеклянном гомогенезаторе. Гомогенат фильтровали через фильтры из нержавеющей стали с отверстиями диаметром 50 - 100 мкм и затем трижды промывали в среде для центрофугирования (СЦ), состоящей из среды 199 с 5% эмбриональной телячьей сыворотки производства НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, 1 мМ буферного раствора НЕПЕС, 50 мкг/мл гентамицина. Суспензии центрифугировали при 4°C, 1500 об/мин, на центрифуге К23 в течение 10 минут.

Количество клеток подсчитывали в камере Горяева, разводя суспензию 100 раз 3%-ной уксусной кислотой, подкрашенной метиленовым синим. Жизнеспособность клеток определяли с помощью 0,1% трипанового синего в физиологическом растворе.

Результаты исследования митогенного действия препарата, а также его воздействие на пролиферацию, вызванную Т-клеточным (КоНА) и В-клеточным (ЛПС) митогенами, приведены в Таблице 6.

Как видно из представленных данных, препарат не обладает митогенными свойствами в исследованном диапазоне доз (от 50 мкг/мл до 12,5 мг/мл). В то же время в более высоких концентрациях препарат угнетал как спонтанную пролиферацию клеток селезенки, так и пролиферацию, индуцированную неспецифическими митогенами (КоНА и ЛПС).

Пример 6. Исследование влияния натриевой соли 5-метиламино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона на функциональную активность естественных киллеров.

Изучено влияние различных концентраций препарата на цитотоксическую активность естественных киллеров (финотипа CD3<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>) при использовании меченых клеток мышей миелобластоидной линии K-562, а также мононуклеарные клетки 10 здоровых доноров крови и 10 больных различной патологией с низкими и высокими уровнями цитотоксичности.

Для этого клетки линий K-562 в соотношении клетки/эффекторы 1:25 (по 100 мкл меченых клеток и 100 мкл мононуклеаров). Исследования проводили в 96-луночных планшетах, в течение 16 - 24 часов инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C. Далее переносили содержимое лунок на фильтры, промывали, высушивали, помещали в раствор со сцинтилляторной жидкостью и определяли показатель на β-счетчике. Цитотоксический индекс вычисляли по формуле

$$ЦИ = 1 - \frac{(A-B)}{(C-B)} \times 100,$$

А - радиоактивность клеток-мишеней в присутствии клеток-эффекторов;

В - радиоактивность оставшихся после обработки клеток трибоном X-100 (максимальный выход);

С - радиоактивность клеток-мишеней в отсутствии клеток-эффекторов.

Полученные результаты представлены в Таблицах 7,8:

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при нормальном уровне ЦИ концентрации препарата (в диапазоне 2,5 - 300 мкг/мл) существенно не модифицируют цитотоксичность естественных киллеров.

Из Таблицы 8 следует, что при исходно высоком уровне ЦИ препарат в дозах 2,5 и 5,0 мкг/мл, достоверно подавляет цитотоксичность, а при исходно низких показателях достоверно стимулирует функциональную активность естественных киллеров, т.е. проявляет способность модулировать цитотоксичность в зависимости от ее исходного уровня.

**Пример 7.** Исследование анафилактогенной активности натриевой соли 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона.

Морским свинкам 3-х групп вводили исследуемый препарат по схеме: 1-я инъекция подкожно в количестве 0,1 мл различными дозами (1 мкг, 10 мкг, 100 мкг), 2-я инъекция через день внутримышечно в область бедра 0,1 мл препарата и еще через день третья инъекция в количестве 0,1 мл. На 21-й день проводилась разрешающая инъекция основного фармакологического действия при однократном использовании. Результаты приведены в Таблице 9.

Таким образом, анафилактическая активность изученного препарата выражена очень слабо и только в высоких дозах.

Кроме рассмотренных выше исследований, проводимых на животных, были проведены клинические исследования иммунокорректирующей активности аминопроизводных 2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона на примере натриевой соли 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона при лечении ряда заболеваний у людей, в частности как противовоспалительное иммунокорректирующее средство при лечении язвенных заболеваний.

Результаты клинических исследований проиллюстрированы примерами 8 - 9:

**Пример 8.** Больная К. 35 лет. Хронически рецидивирующая язва на передне-нижней стенке луковицы размерами около 1,5 см диаметром, глубиной около 0,5 см, на противоположной стенке - "целующаяся" язва 0,3 см диаметром. Сопутствующий катаральный бульбит. Полудомашний режим.

Лечение: Инъекция 100 мг натриевой соли 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона перкульцерально. Повторная инъекция препарата на 7-ой день. Прием препарата в супензии альмагеля, с 7-го дня в маалоксе (в связи с запорами). Омепразол по схеме. С

7-го дня - Де-нол с трихополом.

Значительное ослабление болей на 2-ой день лечения, полное исчезновение болей на 7-ой день. Уменьшение размеров язвы на 1/3 и очищение дна язвенного дефекта на 7-ой день. Эпителизация язвы на верхней стенке и уменьшение явлений бульбита на 7-ой день. На 15 день лечения -- уменьшение размеров язвенного дефекта на 2/3. Полное рубцевание язвы на 21 день. В течение всего курса лечения больной было принято 1000 мг препарата.

**Пример 9.** Исследование эффективности калиевой соли 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона при лечении острых кишечных инфекций (ОКИ).

Эффективность препарата в отношении снижения тяжести проявления разных форм ОКИ оценивалась по предлагаемой программе исследования по 3-х бальной шкале. У 19 из 20 больных интоксикационный синдром исчез в течение 1 - 3-х дней болезни, что позволило оценить как "полное снижение" тяжести болезни, у одного больного как "незначительное снижение" в первые дни и "полное снижение" к 5 дню лечения.

По окончанию исследования была проведена общая оценка клинической эффективности и безопасности препарата по 4-х бальной шкале, в зависимости от нозологических форм, результаты которой представлены в Таблице 10.

Таким образом, у всех 20 наблюдавших больных с различными формами ОКИ препарат оказался эффективным средством лечения, причем у 90% (18 больных) препарат оказал "отличный" и "хороший" эффект.

Из вышеуказанных данных следует, что исследования иммунотропной активности аминопроизводных 2,3-дигидро-1,4-фталазиндионов выявили их дозозависимую иммунокорректирующую активность в интервале от 0,2 мкг до 1000 мг.

#### Формула изобретения:

1. Способ коррекции иммунной системы живого организма с использованием аминодигидрофталазиновых соединений, отличающийся тем, что в качестве иммунокорректоров применяют фармакологически приемлемые аминогидроильные 2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона в эффективной дозе, составляющей 0,2 мкг - 1000 мг.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве иммунокорректоров предпочтительно применяют фармакологически приемлемые металлические соли аминогидроильных 2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона.

Таблица I

Оценка влияния кальциевой соли 5-амино-2,3-дигидроI,4-фталазин диона на неспецифическую резистентность мышей, зараженных E.Coli

Доза препарата (мкг)	Число мышей	Гибель мышей (дни)							Средняя продолжительность жизни
		1	2	3	4	5	6	7	
Заржение E.Coli. шт. 264, доза $10^8$ микр. клеток									
200	10	10	-	-	-	-	-	-	1,0
20	10	10	-	-	-	-	-	-	1,0
2	10	10	-	-	-	-	-	-	1,0
0,2	10	4	-	6	-	-	-	-	2,2
Контр.	10	10							1,0

Таблица 2

Влияние различных доз калиевої соли 5-амино-2,3-дигидроI,4-фталазин диона на фагоцитоз нейтрофилов *in vitro*.

Доза (мкг)	Опыт			Контроль	
	Фагоцит. число	Фагоцит. индекс		Фагоцит. число	Фагоцит. индекс
I	2	3	4	5	
200	78	5,6	77	6,1	
	85	4,7	86	5,1	
	84	9,1	85	8,7	
	71	6,4	72	7,2	
	67	7,4	68	8,1	
Средняя	$77 \pm 0,26$	$6,0 \pm 0,04$	$77,6 \pm 0$	$7,0 \pm 0,04$	
20	80	3,9	76	4,2	
	96	2,8	66	3,5	
	88	4,6	82	6,6	
	94	6,8	82	5,6	

RU ~ 1 6 7 6 5 9 C 1

RU

R U 2 1 6 7 6 5 9 C 1

Продолжение Таблицы 2

	84	13,2	83	5,0
	96	9,1	92	10,0
	86	16,3	74	5,5
	84	5,2	62	4,4
Средняя	89 $\pm$ 1,25	7,8 $\pm$ 0,04	77 $\pm$ 0,35	5,6 $\pm$ 1,1
	88	6,4	87	6,2
	92	4,5	80	7,3
	78	7,4	30	5,8
	84	6,4	80	5,5
	92	5,6	80	9,1
Средняя	86 $\pm$ 0,32	6,0 $\pm$ 0,16	71,4 $\pm$ 0	6,8 $\pm$ 0,02

Таблица 3

Титры гемагглютининов при совместном введении натриевой соли 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазин диона и ЭБ.

R U 2 1 6 7 6 5 9 C 1

Доза пре- парата (мкг)	Линия СВА			Линия С <sub>57</sub> BL <sub>6</sub>		
	7 дней	14 дней	21 день	7 дней	14 дней	21 день
0,2	112 $\pm$ 106	168 $\pm$ 109	15 $\pm$ 13	59 $\pm$ 58	50 $\pm$ 48	266 $\pm$ 200
2	28 $\pm$ 26	154 $\pm$ 97	10 $\pm$ 8	154 $\pm$ 57	256 $\pm$ 0	24 $\pm$ 20
20	96 $\pm$ 37	256 $\pm$ 0	83 $\pm$ 70	91 $\pm$ 64	512 $\pm$ 0	560 $\pm$ 160
200	35 $\pm$ 33	75 $\pm$ 59	46 $\pm$ 32	512 $\pm$ 0	44 $\pm$ 42	160 $\pm$ 138
ЭБ	112 $\pm$ 106	512 $\pm$ 0	24 $\pm$ 12	154 $\pm$ 57	256 $\pm$ 0	27 $\pm$ 15
Контроль	0	4 $\pm$ 0	0	0	4 $\pm$ 0	0

Таблица 4

Титры гемагглютининов при введении препарата через 5 дней после иммунизации ЭБ.

Доза препарата (мкг)	Линия СВА			Линия С <sub>57</sub> BL <sub>6</sub>		
	7 дней	14 дней	21 день	7 дней	14 дней	21 день
0,2	0	9±7	0	0	2±0	35±10
2	10±8	173±110	22±10	13±11	54±50	226±201
20	0	256±0	23±10	26±19	256±0	304±105
200	28±13	158±120	47±30	0	96±42	120±95
ЭБ	III±106	512±0	24±12	154±57	256±0	27±15
Контроль	0	4±0	0	0	4±0	0

Таблица 5

Влияние натриевой соли 6-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазин диона на реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГТЗ) у мышей.

Доза препарата (мкг)	Индекс реакции	
	Линия СВА	Линия С <sub>57</sub> BL <sub>6</sub>
2	II±8	19±9
20	10±5	16±9
200	2±1,5	15±6
Контроль	6±3,5	12±7

R U 2 1 6 7 6 5 9 C 1

C 1 6 7 6 5 9 C 1

Таблица 6

Влияние гидрохлорида 5-амино-2,3-дигидро-I,4-фталазин диона на пролиферацию лимфоидных клеток.

Концентрация препарата	Митоген, добавленный в культуру клеток селезенки	КоА	ЛПС
-	-	-	-
-	3534 <sup>±</sup> 563	17896 <sup>±</sup> 2080	18874 <sup>±</sup> 355
50 мкг/мл	2576 <sup>±</sup> 237	11860 <sup>±</sup> 1566	13232 <sup>±</sup> 928
500 мкг/мл	1763 <sup>±</sup> 94	1323 <sup>±</sup> 192	3870 <sup>±</sup> 308
2,5 мг/мл	249 <sup>±</sup> 93	195 <sup>±</sup> 27	251 <sup>±</sup> 44
12,5 мг/мл	369 <sup>±</sup> 56	178 <sup>±</sup> 28	256 <sup>±</sup> 40

Таблица 7

Влияние различных концентраций натриевой соли 5-метиламино-2,3-дигидро-I,4-фталазин диона на цитотоксический индекс в зависимости от уровня ЦИ контроля.

Конц., препарата, мкг/мл	ЦИ, %.
Контроль	41,0 <sup>±</sup> 3,0
2,5	41,9 <sup>±</sup> 2,8
5,0	38,8 <sup>±</sup> 3,1
10,0	40,8 <sup>±</sup> 3,0
25,0	41,4 <sup>±</sup> 3,0
50,0	39,1 <sup>±</sup> 4,0
75,0	37,7 <sup>±</sup> 4,1
150,0	41,0 <sup>±</sup> 3,5
300,0	39,0 <sup>±</sup> 3,1

R U ~ 1 6 7 6 5 9 C 1

R U

R U 2 1 6 7 6 5 9 C 1

Таблица 8

Влияние низких концентраций натриевой соли 5-метиламино-2,3-дигидро-1,4-фталазин дисона на цитотоксический индекс в зависимости от его уровня в контроле.

Конц. препарата, мкг/мл	Уровень цитотоксического индекса % (M)		
	Средний	Высокий	Низкий
Контроль	41,0±0,8	64±0,8	20,7±1,0
2,5	41,9±0,9	57±0,7	34±1,3
5,0	38,8±0,34	54±0,8	30±1,2
Число наблюдений	10	10	10

Таблица 9

Выраженность анафилактического шока.

Сенсибилизация препаратором (мкг)	Разрешающая инъекция (мкг)	Кол-во животн.	Выраженность анафилакт. шока					Индекс Вейгла
			-	+	++	+++	++++	
100	100	10	5	1	1	-	-	0,3
10	100	10	7	2	-	-	-	0,2
1,0	100	10	10	-	-	-	-	

R U 2 1 6 7 6 5 9 C 1

R U - 1 6 7 6 5 9 C 1

Таблица 10

Эффективность калиевой соли 5-амино-2,3-дигидро-I,4-фталазиндиона  
при различных формах ОКИ.

Форма болезни	Всего больных	Эффект препарата			
		Отличный	Хороший	Удовл.	Без эф.
Острая дизентерия	9	1	7	1	-
Сальмонеллез	3	1	2	-	-
Пищевая интоксикация	4	1	3	-	-
Острый гастроэнтерит	4	2	1	1	-
ВСЕГО:	20	5	13	2	-

R U 2 1 6 7 6 5 9 C 1

R U 2 1 6 7 6 5 9 C 1